

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



REC'D 06 AUG 2003
WIPO PCT

Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 102 31 574.4

Anmeldetag: 11. Juli 2002

Anmelder/Inhaber: Sartorius AG, Göttingen/DE

Bezeichnung: Membran, Vorrichtung und Verfahren zum Entfernen von Proteasen aus Flüssigkeiten

IPC: B 01 D, C 12 N

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 5. Mai 2003
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Zitzenzier".

Zitzenzier

Anmelder: Sartorius AG, Göttingen
Anwaltsakte: P-SAR 30

5 Membran, Vorrichtung und Verfahren zum Entfernen von Proteasen aus Flüssigkeiten

10 Beschreibung

Die Erfindung betrifft eine Membran zum Entfernen von Proteasen aus Flüssigkeiten, insbesondere aus biologischen Flüssigkeiten und pharmazeutischen Lösungen, bestehend aus einem
15 mikroporösen Membrankörper.

Die Erfindung betrifft weiterhin eine Vorrichtung zum Entfernen von Proteasen aus Flüssigkeiten, insbesondere aus biologischen Flüssigkeiten und pharmazeutischen Lösungen, mit einer Mehrzahl in Reihe geschalteter Membranen.
20

Die Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zum Entfernen von Proteasen aus Flüssigkeiten, insbesondere aus biologischen Flüssigkeiten und pharmazeutischen Lösungen durch Mikrofiltration mit mikroporösen chemisch aktivierten Membranen.

Die Stabilität pharmazeutischer proteinhaltiger Lösungen ist von verschiedenen Faktoren und vor allem von der Art der Vorbehandlung abhängig. Es ist von größtmöglicher Bedeutung,
30 dass Kontaminationen aller Art aus diesen Lösungen entfernt werden, da die regulatorischen Behörden zahlreiche Kontrollen dieser Prozeduren vorschreiben.

Eine Verunreinigung mit Bakterien oder Pilzen kann beispielsweise leicht dadurch verhindert werden, dass die Lösung durch
35 eine sterilfiltrierende mikroporöse Membran mit bspw. nomi-

neller Porenweite von 0,2 µm filtriert wird. Viren können durch chemische Behandlung oder durch Anwendung eines stark basischen Ionenaustauschers abgereichert werden. Endotoxine können ebenfalls durch einen basischen Ionenaustauscher oder 5 durch Ultrafiltration entfernt werden.

Proteasen sind Enzyme, welche Proteine und Polypeptide abbauen. Dies geschieht durch hydrolytische Spaltung zwischen benachbarten Aminosäuren, welche die Bausteine der Proteine 10 darstellen. Dies führt zur Reduktion des formulierten Proteins, z.B. eines Antikörpers und zum Auftreten von Abbauprodukten, die unerwünschte Effekte in dem mit der Formulierung behandelten Patienten erzeugen.

15 Während der Aufarbeitung (Down Stream Processing) eines Proteins, z.B. eines gentechnisch hergestellten Antikörpers, der in einer Tierzellkultur produziert wird, kann der Antikörper in der Zelle akkumulieren und muss vor der Aufarbeitung aus der Zelle in das Prozessmedium für die weitere Aufarbeitung 20 freigesetzt werden. Während dieser Zelldesintegration werden gleichzeitig zelleigene Proteasen freigesetzt, welche sofort die Zielproteine abbauen können.

Um die Wirkung dieser Proteasen zu unterbinden und zumindest zu verlangsamen, ist es bekannt, kleine synthetische Moleküle mit inhibitorischer Wirkung und sehr hoher Affinität zum aktiven Zentrum der Proteasen zuzusetzen. Nachteilig dabei ist die potentielle Gefährlichkeit solcher Substanzen, ihre geringe Löslichkeit und geringe Stabilität in wässrigen Medien. 30 Deshalb ist eine schnelle und effiziente Verteilung solcher Substanzen in großen Volumina umständlich.

Weiterhin ist es bekannt, auf dem Fachmann auf diesem Gebiet 35 bekannten chromatographischen Trägern, wie kugelförmigen Gelen, geeignete Inhibitoren zu immobilisieren. Da die Entfer-

nung wünschenswerterweise möglichst weit „up stream“ in der Reinigungssequenz erfolgen soll, um den Produktverlust gering zu halten, werden für die Aufarbeitung Säulen mit großen Querschnitten benötigt. Dies macht den Schritt kosten- und
5 arbeitsintensiv.

Aus der US 6,258,238 B1 ist es bekannt, einen kationischen Protease-Inhibitor durch Bulk-Adsorption an der Oberfläche einer semipermeablen Membran, die mindestens aus einem elektro-
10 ronegativen Polymer besteht, anzuordnen.

Nachteilig dabei ist, dass die dabei verwendete Membran bzw. der verwendete Membrankörper nicht elektrisch neutral sondern durch ein verwendetes Monomer negativ geladen ist. Weiterhin
15 ist es schwierig geeignete Inhibitoren für andere Proteaseklassen zu finden.

Weiterhin ist aus der DE 44 32 628 A1 eine modular aufgebaute Dead-End-Filtrationseinheit zur selektiven Abtrennung von
20 Stoffen aus Fluiden durch Filtration an porösen Membranabsorbern bekannt. Entsprechend einer spezifischen Adsorption werden die einzelnen abzutrennenden Stoffe in den Filterkassetten bzw. Membranen festgehalten. Mit entsprechenden Eluatationsmitteln werden die adsorbierten Stoffe selektiv desorbiert, eluiert und aufgefangen. Bei der aus der DE 44 32 628 A1 bekannten Vorrichtung bzw. bekannten Verfahren werden keine Inhibitor-Membranen verwendet, sondern ionenaustauschende bzw. farbstoffligandentragende Membranen. Bei einer derartigen adsorptiven Anwendung ist es schwierig alle Klassen von
30 bekannten Proteasen an den Membrankörper adsorptiv anzubinden.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es daher, Membranen zur Entfernung einer Vielzahl von Proteasen aus Flüssigkeiten
35 bereitzustellen, so dass die Wirkungen der Proteasen bezüg-

lich der Flüssigkeiten unterbunden oder zumindest verlangsamt werden. Die Entfernung der Proteasen soll schnell, effizient und kostengünstig erfolgen. Dabei soll es möglich sein, saure Proteasen, Metallo-Proteasen, Cystein-Proteasen und / oder Serin-Proteasen selektiv zu entfernen.

Diese Aufgabe wird in Verbindung mit dem Oberbegriff des Anspruches 1 dadurch gelöst, dass Proteasen selektiv bindende Inhibitoren durch chemisch aktivierte Gruppen an den Membrankörper angekoppelt sind.

Die Verwendung derartiger Membranen hat den Vorteil, dass der konvektive Fluss durch solche Membranen höher ist im Vergleich zu entsprechenden Säulen, da die Diffusionslimitierung des Massentransportes praktisch vernachlässigbar ist. Die Menge an Inhibitor und die zur Kopplung benötigte Membranfläche kann auf die zu entfernende Menge Proteasen abgestimmt werden. Die Membran kann nach Gebrauch verworfen werden, was Reinigungs- und Validierungs-Kosten spart.

Saure Proteasen, die einen Asparaginsäure-Rest im aktiven Zentrum besitzen, können durch einen entsprechenden Inhibitor an den Membrankörper adsorbiert werden. So kann beispielsweise Pepstatin, dass effizient Pepsin inhibitiert, angekoppelt werden. Metallo-Proteasen, die ein Übergangsmetall, wie z.B. Zink, im aktiven Zentrum besitzen, können beispielsweise durch Bestatin, Diprotin oder EDTA, die an die Membrankörper angekoppelt werden, adsorbiert werden.

Cystein-Proteasen, die einen Cystein-Rest im aktiven Zentrum besitzen, beispielsweise Papain aus der Papaya-Frucht, können durch Antipain, Chymostatin oder E 64, die an den Membrankörper angekoppelt werden, adsorbiert werden.

Serin-Proteasen, die wegen ihres ubiquitären Vorkommens wichtigste Familie, können ebenfalls durch entsprechende Inhibitoren, die an den Membrankörper angekoppelt werden, gebunden werden. Als effiziente Inhibitoren kommen TLCK und p-
5 Aminobenzamidin in Frage. Die oben erwähnten Inhibitoren sind kleine Moleküle, zum Teil peptidartige Peptid-Analoga. Sie sind alle kommerziell erhältlich.

Für die Cystein- und Serin-Proteasen existieren weiterhin
10 große proteinartige Inhibitoren, wie Aprotinin, Sojabohnen-, Trypsin-Inhibitoren oder alpha-2-Makroglobulin. Zudem ist eine riesige Anzahl weiterer Inhibitoren in der Literatur beschrieben, die auf die erfindungsgemäße Weise verwendbar sind.

15 Die bekannten Vorrichtungen weisen die oben beschriebenen Nachteile auf.

Weitere Aufgabe der Erfindung ist es daher, die bekannten
20 Vorrichtungen so zu verbessern, dass eine Vielzahl von Proteasen aus biologischen Flüssigkeiten und pharmazeutischen Lösungen effektiv und kostengünstig entfernt werden können.

Diese weitere Aufgabe wird erfindungsgemäß in Verbindung mit dem Oberbegriff des Anspruches 10 dadurch gelöst, dass die Membranen nach einem der Ansprüche 1 bis 9 ausgebildet sind.

Durch die Ausbildung der Membranen nach einem der Ansprüche 1 bis 9 weist die Vorrichtung die oben genannten Vorteile auf.
30 Insbesondere wird durch die Reihenschaltung bzw. Anordnung einer Mehrzahl von Membranen hintereinander gewährleistet, dass die zu prozessierende Flüssigkeit nacheinander alle Membranen sequentiell durchströmt. Die Membranen können dem jeweiligen Trennproblem relativ einfach angepasst werden.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung weisen die einzelnen Membranen jeweils einen Membrankörper mit einem anderen angekoppelten Inhibitor auf.

- 5 Auf diese Weise kann das jeweilige Proteasespektrum der verschiedenen zu prozessierenden Flüssigkeiten für die Aufarbeitung berücksichtigt werden.

Zur einfachen Handhabung werden die einzelnen Membranen zur 10 sequentiellen Durchströmung in geeignete Gehäuse eingebaut.

Die bekannten Verfahren zur Entfernung von Proteasen weisen die oben genannten Nachteile auf.

- 15 Weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es daher, ein effizientes und kostengünstiges Verfahren zum Entfernen einer Vielzahl von Proteasen anzugeben.

Diese Aufgabe wird in Verbindung mit dem Oberbegriff des An- 20 spruches 13 dadurch gelöst, dass an die Membranen Inhibitoren über chemisch aktivierte Gruppen angekoppelt werden, durch die die Proteasen durch selektive Anbindung adsorbiert und dadurch aus der Flüssigkeit entfernt werden.

Durch die selektive Anbindung wird eine effektive und kosten- 25 günstige Entfernung einer Vielzahl von Proteasen ermöglicht.

- Weitere Einzelheiten der Erfindung ergeben sich aus der nach- 30 folgenden ausführlichen Beschreibung und der beigefügten Zeichnung, in denen bevorzugte Ausführungsformen der Erfin- dung beispielhaft veranschaulicht sind.

Figur 1: Eine schematische Darstellung einer Vorrichtung zum Entfernen von Proteasen.

Eine Vorrichtung 1 zum Entfernen von Proteasen besteht im Wesentlichen aus einem Gehäuse 2 und vier in Reihe angeordneten mikroporösen Membranen 3, 4, 5, 6.

- 5 Die erste Membran 3 weist einen ersten Membrankörper 7 auf, an dem ein saure Proteasen bindender Inhibitor über eine chemisch aktivierte Gruppe angekoppelt ist. Beispielsweise ist Pepstatin als effizienter Inhibitor für Pepsin geeignet.
- 10 Die zweite Membran 4 weist einen zweiten Membrankörper 8 auf, an dem ein Metallo-Proteasen bindender Inhibitor über eine chemisch aktivierte Gruppe angekoppelt ist. Für die Metallo-Proteasen kommen beispielsweise Bestatin, Diprotin oder EDTA als anzukoppelnde Inhibitoren in Frage.
- 15 Die dritte Membran 5 weist einen dritten Membrankörper 9 auf, an dem ein Cystein-Proteasen bindender Inhibitor über eine chemisch aktivierte Gruppe angekoppelt ist. Als Inhibitoren sind beispielsweise Antipain, Chymostatin oder E 64 geeignet.
- 20 Die vierte Membran 6 weist einen vierten Membrankörper 10 auf, an dem ein Serin-Proteasen bindender Inhibitor über eine chemisch aktivierte Gruppe angekoppelt ist.

25 Als Inhibitoren kommen beispielsweise TLCK oder p-Aminobenzamidin in Frage.

- Die zu prozessierende Flüssigkeit wird über einen am Gehäuse 2 angeordneten Anschluss 11 der ersten Membran 3 zugeführt, wobei an den Inhibitor des ersten Membrankörpers 7 die entsprechenden sauren Proteasen gebunden werden. Die weiter zu prozessierende Flüssigkeit wird anschließend der zweiten Membran 4 zugeführt, wobei an den Inhibitor des zweiten Membrankörpers 8 die entsprechenden Metallo-Proteasen gebunden werden. Die weiter zu prozessierende Flüssigkeit wird anschließend der dritten Membran 5 zugeführt, wobei an den In-

hibitor des dritten Membrankörpers 9 die entsprechenden Cystein-Proteasen gebunden werden. Schließlich wird die weiter zu prozessierende Flüssigkeit der vierten Membran 6 zugeführt, wobei an den Inhibitor des vierten Membrankörpers 10 5 die entsprechenden Serin-Proteasen gebunden werden.

Aus der zu prozessierenden Flüssigkeit sind nunmehr die vorgesehenen Proteasen selektiv entfernt, so dass diese über einen Abfluss 12 einer weiteren Verwendung zugeführt werden 10 kann. Die Membranen 3, 4, 5, 6 mit den gebundenen Proteasen werden weggeworfen bzw. entsorgt.

Die folgenden Beispiele zeigen die Möglichkeit der Kupplung verschiedener Inhibitoren an eine chemisch aktivierte Membran 15 bzw. Membrankörper und stellen deshalb keinerlei Einschränkung der Erfindung dar. Die Prozeduren folgen dabei im Wesentlichen dem Protokoll beschrieben in: G.T. Hermanson, A.K. Mallia, P.K. Smith, Immobilized Affinity Ligand Techniques, Academic Press 1992, p. 119

20

Beispiel 1:

Der Serin-Protease Inhibitor p-Aminobenzamidin (Sigma, Deisenhofen Best. Nr. A-7148 wurde in 0,05 M Kalium-Phosphat-Puffer pH 8,0 zu 20 mg/ml gelöst. Zehn epoxy aktivierte Membranen der Abmessung 25 mm Durchmesser des Typs 18706 der Fa. Sartorius AG wurden in dieser Lösung bei 45°C über Nacht inkubiert. Die Membranen/Membrankörper wurden mit PBS mehrfach gewaschen. Drei Membranen mit einem Durchmesser von 25 mm 30 wurden in einen Filterhalter (Sartorius Teil Nr. 16517 eingelegt. Trypsin vom Rinderpankreas (SIGMA Best. Nr. T-8003 Lot Nr. 28F-8065 wurde in PBS zu 1 mg/ml gelöst. 10 ml dieser Lösung wurde über die Membranen mittels Schwerkraft filtriert. Die Membranen wurden mit 10 ml PBS gewaschen. Das gebundene 35 Trypsin wurde mit 3 ml 0,1 M Glyzin eingestellt auf pH 3,0

mit HCl eluiert. Die enzymatische Aktivität des Trypsins in den verschiedenen Fraktionen wurde mit dem synthetischen Substrat Benzoyl-Arginin-Ethylester (BAEE) einem bekannten Substrat für Trypsin in einem UV-Spektrophotometer bestimmt.
5 Diese wurden mit Aktivitäten von Trypsinlösungen bekannter Konzentration verglichen.

In eine Quarzküvette wurde folgendes pipettiert:

10 0,85 ml einer Lösung von 0,05 M Tris eingestellt mit HCl auf pH 8,5, 0,2 ml einer Lösung von 2 mg/ml BAEE in Wasser und 0,05 ml Probe. Die Zunahme der Absorption bei 253 nm wurde über 30 Sekunden verfolgt.

15 Die folgenden Ergebnisse wurden erhalten und sind in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Bindung von Trypsin an eine mikroporöse mit Epoxigruppen funktionalisierte Membranen

Fraktion	Volumen ml	Aktivität E253/min	μg Trypsin angeboten	μg Trypsin gebunden
Ausg. lsg.	10	0,24	2000	--
Durchlauf	10	0,144		930

Der Versuch wurde mit gleichem Ergebnis 2 x wiederholt.

Das Beispiel zeigt klar die Bindung von Trypsin an der mit dem Inhibitor beladenen Membrane/Membrankörper.

25

Beispiel 2:

Der Cystein-Protease Inhibitor Leupeptin (Sigma, Deisenhofen Best. Nr. L-2023) wurde in 0,05 M Kalium-Phosphat-Puffer pH 8,0 zu 20 mg/ml gelöst. Zehn epoxy aktivierte Membranen/Membrankörper der Abmessung 25 mm Durchmesser des Typs
30

18706 der Fa. Sartorius AG wurden in dieser Lösung bei 45°C über Nacht inkubiert. Die Membranen wurden mit PBS mehrfach gewaschen. Drei Membranen mit einem Durchmesser von 25 mm wurde in einen Filterhalter (Sartorius Teil Nr. 16517 eingelegt. Papain aus Papaya carica (Merck Art. Nr. 7144 Ch. 9I1 F739244, 30 000 USP - U/mg) wurde zu 2 mg/ml in folgendem gelöst: 1,1 mM EDTA, 0,67 mM Mercaptoethanol, 5,5 mM Cystein 50 mM Na-Azetat pH 5,5; = Komplett und mindestens 30 min bei RT stehen gelassen. Die enzymatische Aktivität des Papains in den verschiedenen Fraktionen wurde mit dem synthetischen Substrat Benzoyl-Arginin-Nitroanilid (BANA), einem bekannten Substrat für Papain in einem UV-Spektrophotometer bestimmt. Diese wurden mit Aktivitäten von Papainlösungen bekannter Konzentration verglichen.

15

In eine Quarzküvette wurde folgendes pipettiert:

0,5 ml Enzymlösung 0,05 ml 25 mg/ml BANA in DMSO, 0,45 ml Komplett.

20 Die folgenden Ergebnisse wurden erhalten und sind in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2: Bindung von Papain an eine mikroporöse mit Leupeptin funktionalisierte Membrane

Fraktion	Volumen ml	Aktivität E253/min	µg Papain angeboten	µg Papain gebunden
Ausg.1sg.	5	0,05	1900	--
Durchlauf	5	0,03		760

Der Versuch wurde mit gleichem Ergebnis 2 x wiederholt.

Das Beispiel zeigt klar die Bindung von Papain an der mit dem
30 Inhibitor beladenen Membrane/Membrankörper.

Anmelder: Sartorius AG, Göttingen
Anwaltsakte: P-SAR 30

5 Patentansprüche

1. Membran zum Entfernen von Proteasen aus Flüssigkeiten, bestehend aus einem mikroporösen Membrankörper, **dadurch gekennzeichnet**, dass Proteasen selektiv bindende Inhibitoren durch chemisch aktivierte Gruppen an den Membrankörper (7, 8, 9, 10) angekoppelt sind.
2. Membran nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass ein saure Proteasen bindender Inhibitor an den Membrankörper (7) angekoppelt ist.
3. Membran nach Anspruch 2, **dadurch gekennzeichnet**, dass Pepstatin an den Membrankörper (7) angekoppelt ist.
4. Membran nach einem der Ansprüche 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet**, dass ein Metallo-Proteasen bindender Inhibitor an dem Membrankörper (8) angekoppelt ist.
5. Membran nach Anspruch 4, **dadurch gekennzeichnet**, dass Bestatin, Diprotin oder EDTA an den Membrankörper (8) angekoppelt ist.
6. Membran nach einem der Ansprüche 1 bis 5, **dadurch gekennzeichnet**, dass ein Cystein-Proteasen bindender Inhibitor an den Membrankörper (9) angekoppelt ist.
7. Membran nach Anspruch 6, **dadurch gekennzeichnet**, dass Antipain, Chymostatin, Leupeptin oder E64 an den Membrankörper (9) angekoppelt ist.

8. Membran nach einem der Ansprüche 1 bis 7, **dadurch gekennzeichnet**, dass ein Serin-Proteasen bindender Inhibitor an den Membrankörper (10) angekoppelt ist.
- 5 9. Membran nach Anspruch 8, **dadurch gekennzeichnet**, dass TLCK oder p-Aminobenzamidin an den Membrankörper (10) angekoppelt ist.
- 10 10. Vorrichtung zum Entfernen von Proteasen aus biologischen Flüssigkeiten und pharmazeutischen Lösungen mit einer Mehrzahl in Reihe geschalteter Membranen, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Membranen (3, 4, 5, 6) nach einem der Ansprüche 1 bis 9 ausgebildet sind.
- 15 11. Vorrichtung nach Anspruch 10, **dadurch gekennzeichnet**, dass die einzelnen Membranen (3, 4, 5, 6) jeweils einen Membrankörper (7, 8, 9, 10) mit einem anderen angekoppelten Inhibitor aufweisen.
- 20 12. Vorrichtung nach Anspruch 10 oder 11, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Membranen (3, 4, 5, 6) in ein zur sequentiellen Durchströmung der Membranen (3, 4, 5, 6) geeignetes Gehäuse (2) eingebaut sind.
- 25 13. Verfahren zum Entfernen von Proteasen aus biologischen Flüssigkeiten und pharmazeutischen Lösungen durch Mikrofiltration mit mikroporösen aktivierten Membranen, **dadurch gekennzeichnet**, dass an die Membranen (3, 4, 5, 6) Inhibitoren über chemisch aktivierte Gruppen angekoppelt werden, durch 30 die die Proteasen durch selektive Anbindung entfernt werden.

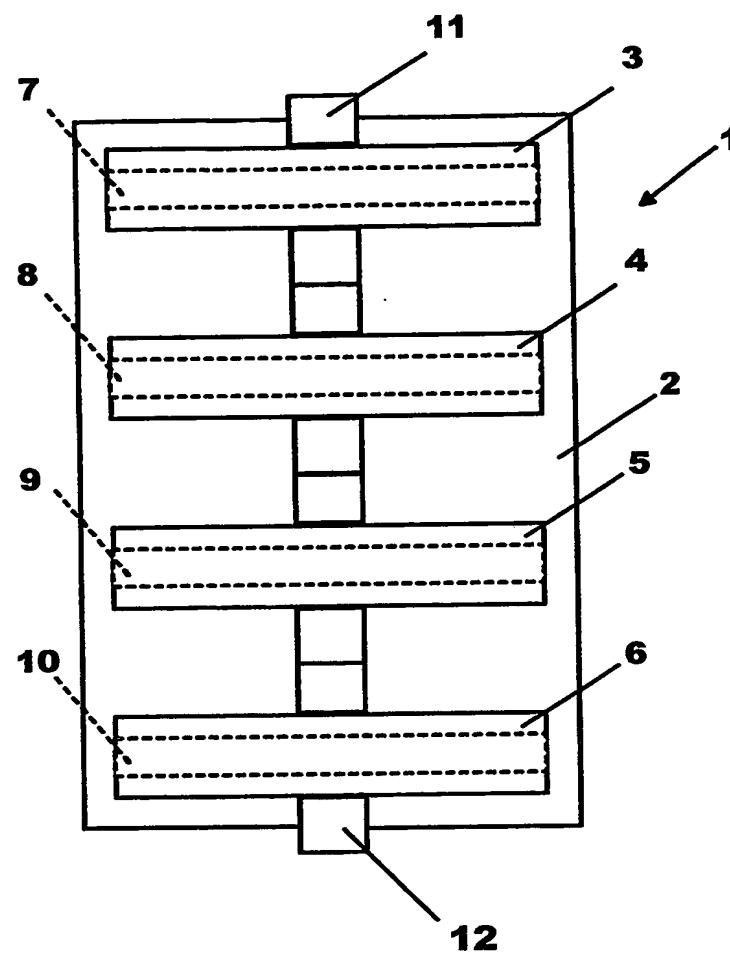


Fig. 1

Anmelder: Sartorius AG, Göttingen
Anwaltsakte: P-SAR 30

Zusammenfassung

Membran und Vorrichtung zum Entfernen von Proteasen aus Flüssigkeiten, insbesondere aus biologischen Flüssigkeiten und pharmazeutischen Lösungen, bestehend aus einem mikroporösen Membrankörper, wobei Proteasen selektiv bindende Inhibitoren durch chemisch aktivierte Gruppen an den Membrankörper angekoppelt sind.

Verfahren zum Entfernen von Proteasen aus Flüssigkeiten, insbesondere aus biologischen Flüssigkeiten und pharmazeutischen Lösungen, durch Mikrofiltration mit mikroporösen aktivierten Membranen, wobei an die Membranen Inhibitoren über chemisch aktivierte Gruppen angekoppelt werden, durch die die Proteasen durch selektive Anbindung entfernt werden.